

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode Deskriptif Cross Sectional untuk dapat membandingkan profil dan jumlah mikrobiota air minum kemasan merk A dengan air minum isi ulang di Kota Depok tahun 2021. Penelitian akan dilakukan dengan mengidentifikasi kuman pada sampel.

3.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

3.2.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Indonesia.

3.2.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Oktober sampai dengan November 2021.

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

Bahan yang akan diuji adalah sampel air minum kemasan merk A dengan sampel air minum isi ulang B dan C di Kota Depok.

3.4 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Sampel penelitian diperoleh dengan membeli 1 galon air minum kemasan merk A dan air minum isi ulang B dan C.

3.4.1 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi merupakan suatu kriteria umum dalam penelitian yang dapat mewakili pemenuhan syarat sebagai suatu sampel. Kriteria Inklusi dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- Air minum kemasan merk A dan air minum isi ulang.
- Air minum kemasan tidak melewati tanggal kadaluarsa.

- Pengambilan air minum isi ulang tetap memperhatikan teknik aseptis.

3.4.2 Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi merupakan suatu kriteria yang tidak dapat mewakili pemenuhan syarat sebagai suatu sampel. Kriteria eksklusi dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- Pengambilan air minum isi ulang lebih dari 24 jam dari pemeriksaan.
- Pengelolaan sampel yang tidak baik.

3.5 Instrumen Penelitian

3.5.1 Alat Penelitian

- Sarung tangan lateks
- Masker
- Tisu
- Rak tabung reaksi
- Tabung reaksi
- Tabung Durham
- Tabung elemeyer
- Gelas beker
- Ose bulat
- Ose jarum
- Sduit 100 ml
- Bunsen
- Kaca objek
- Cawan petri
- Inkubator
- Mikroskop Cahaya perbesaran 1000x
- Kontainer penyimpanan
- Wadah/ pot steril

- autoklaf

3.5.2 Bahan Penelitian

- Sampel air minum kemasan merk A
- Sampel air minum isi ulang B
- Sampel air minum isi ulang C
- *Agar Eosin Methylen Blue* (EMB)
- *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA)
- Media gula-gula (glukosa, laktosa, sakarosa, maltosa, mannitol)
- Media Indol
- Media *Voges-proskauer* (VP)
- Media Sitrat
- Media Semisolid
- Media Merah Metil
- karbol kristal ungu
- lugol/iodin
- alkohol 96%
- *air fuksin*
- *xylol*
- minyak emersi
- *Lysol*

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Sterilisasi Alat

Semua alat disterilisasi dengan menggunakan autoklaf bertekanan 1,5 atm selama 15-20 menit pada suhu 121°C.

3.6.2 Pengambilan Sampel

Peneliti menggunakan sarung tangan lateks steril dan masker. Kemudian mulut galon diusap dengan menggunakan tisu alkohol. Air diambil dengan menggunakan spuit steril sebanyak 100 ml dan tanpa

dipindahkan ke tempat lain, spuit disimpan didalam kontainer untuk dibawa ke maksimal 24 jam dari waktu pengambilan.²⁹

3.6.3 Penanaman Sampel

Sampel air ditanam pada media selektif EMB untuk pertumbuhan bakteri Gram negatif karena mengandung Eosin Methylene Blue yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif. Kemudian sampel diratakan dengan menggunakan ose sampai tersebar merata ke seluruh permukaan lempeng agar. Selanjutnya di inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.³⁰

Kuman yang telah di inkubasi selama 24 jam kemudian akan dihitung jumlah koloninya, ditanam pada *nutrient agar* sebagai stok, dan dilanjutkan dengan pewarnaan Gram. Jika bakteri tidak tumbuh lebih dari 48 jam, maka harus dilakukan kultur ulang.

3.6.4 Pewarnaan Gram

Proses pewarnaan Gram dimulai dengan dibuat tanda lingkaran 2x3 cm dibawah kaca objek, kemudian dibuat suspensi kuman dengan meneteskan 1 tetes NaCl fisiologis steril di kaca objek dan campurkan dengan 1 koloni kuman. Suspensi disebarkan sesuai lingkaran dan dibiarkan mengering. Setelah kering dilakukan fiksasi.

Setelah dibuat preparat, bakteri diwarnai dengan cara diteteskan karbol kristal ungu dan dibiarkan selama 5 menit lalu dicuci dengan air mengalir. Kemudian dituangi cairan lugol selama 1 menit lalu dicuci dengan air mengalir. Preparat dicelupkan kedalam alkohol 96% selama 30 detik sambil digoyang untuk menghilangkan zat warna dan dicuci dengan air mengalir. Terakhir, preparat ditetesi *air fukhsin* selama 2 menit lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan menggunakan tisu atau kertas saring. Pada Gram (+), dinding peptidoglikan bakteri lebih tebal dan mampu mengikat zat warna utama dan tidak luntur meski sudah dicuci. Sementara Gram (-) yang berdinding tipis, akan lebih mudah melepas zat warna sehingga hanya mengikat zat warna yang terakhir diberikan³⁰

Jika ditemukan kuman batang Gram negatif, dilanjutkan dengan uji biokimia untuk mengidentifikasi bakteri.

3.6.5 Identifikasi Bakteri

Setelah didapatkan hasil pewarnaan Gram, kuman diidentifikasi melalui serangkaian uji biokimia untuk membedakan jenis bakteri.

3.6.5.1 Uji Peragian Gula-Gula

Peragian gula-gula bertujuan untuk melihat kemampuan kuman meragi gula (glukosa, laktosa, mannitol, maltosa, dan sakarosa). Bila terjadi peragian, indikator akan menjadi warna kuning tanda terjadinya perubahan pH dari netral menjadi asam. Dilihat pula pada tabung Durham ada tidaknya gelembung gas yang menandakan kuman menghasilkan gas dalam proses peragian.³⁰

3.6.5.2 Uji TSIA

Uji kuman dengan Triple Sugar Iron Agar (TSIA) dilakukan untuk melihat kemampuan kuman meragi glukosa, laktosa, dan sakarosa dengan indikator merah fenol, mengetahui kemampuan kuman menghasilkan gas CO₂ dan gas H₂S. Media juga mengandung sodium thiosulfat dan ferro sulfat yang bereaksi jika kuman mengeluarkan enzim disulfurase yang menguraikan asam amino sistein menjadi asam disulfida dan menghasilkan gas hidrogen sulfida (H₂S). H₂S kemudian bereaksi dengan ferro sulfat menjadi ferro sulfida berwarna hitam.³⁰

3.6.5.3 Uji Indol

Uji Indol digunakan untuk melihat kemampuan kuman menghasilkan enzim *tryptophanase* yang akan menghidrolisis asam amino triptofan yang terkandung pada media dan memberikan gambaran cincin indol berwarna merah.³⁰

3.6.5.4 Uji VP

Uji VP dilakukan untuk membuktikan kuman mampu menghasilkan asetil metil karbinol yang akan memberikan gambaran larutan merah tembaga.³⁰

3.6.5.5 Uji Sitrat

Uji sitrat dengan menggunakan media sitrat yang mengandung indikator *Blue Brom Thymol* untuk melihat kemampuan kuman menggunakan sitrat sebagai sumber karbon.³⁰

3.6.5.6 Uji Semisolid

Uji semisolid digunakan untuk melihat pergerakan kuman dengan menusukkan kuman menggunakan ose lurus ke media agar.³⁰

3.6.5.7 Uji Merah Metil

Uji merah metil digunakan untuk mengidentifikasi bakteri yang mampu menghasilkan asam secara stabil dan mempertahankan pH sehingga menghasilkan perubahan warna media menjadi merah.³⁰

3.7 Hasil Identifikasi Bakteri

NO	Bakteri	Gula-gula					TSIA			Indol	VP	Sitrat	Semisolid	Merah metil
		Glu	Lak	Man	Mal	Sak	H ₂ S	Gas	Gula (Lak, Sak, Glu)					
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	Tidak meragi gula	-	-	+	+	-
2	<i>Escherischia coli</i>	+	+	+	+	+	-	+	meragi gula	+	-	-	+	+
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	-	+	meragi gula	-	+/-	+	-	+
4	<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+	+	+	+	-	+	meragi gula	-	-	+	+	+
5	<i>Shigella dysenteriae</i>	+	-	+	+	-	-	-	tidak meragi laktosa	-	-	-	-	+
6	<i>Salmonella typhi</i>	+	+	+	+	+	+	-	tidak meragi laktosa	-	-	-	+	+
7	<i>Proteus mirabilis</i>	+	-	-	-	-	+	+	tidak meragi laktosa	-	-	+	+	+

Tabel 3. 1 Hasil Uji Biokimia Bakteri Gram negatif. 21, (Dengan modifikasi)